



RESUMEN

Regulación genética de matrix metaloproteasas y sus inhibidores

Autor: CLARA LUZ SAMPIERI RAMÍREZ

Coautores: Robert K. Nuttall, David A. Young, Deborah Goldspink, Ian M. Clark y Dylan R. Edwards

Area de Investigación: Biomedicina

Institución: Instituto de Salud Pública y School of Biological

Año Residencia: -----

Hospital: -----

Matricula/Número Personal: 32723

Teléfono Laboral: 8418900

Extensión: 13327

Teléfono Particular: 8140109

Teléfono Celular: 044 2281460802

Email: csampieri@uv.mx

Email Alternativo: sampieri026@yahoo.com

Tipo de Autor: Docente-Investigador

Dependencia: Universidad Veracruzana (autor principal)

Marco teórico:

Las *matrix* metaloproteinasas (MMPS) humanas se agrupan en una familia de 24 endopeptidasas que degradan virtualmente todos los componentes de la *matrix* extracelular. Las MMPS participan en varios procesos fisiológicos, tales como ovulación, migración celular, angiogénesis, implantación y desarrollo embrional. Asimismo, juegan un papel importante en procesos patológicos como invasión tumoral, enfermedades cardiovasculares, úlcera gástrica, artritis y osteoartritis. La regulación de la actividad de las MMPS ocurre en diversos niveles como: transcripción, estabilización del mRNA, eficacia de traducción, compartimentalización enzimática y secreción. La actividad de MMPS es bloqueada principalmente por la acción de cuatro inhibidores denominados TIMPS, de sus siglas en inglés: *tissue inhibitor of matrix metaloproteinases*. Las TIMPS tienen muchas semejanzas, pero también exhiben características estructurales y patrones de expresión particulares, lo cual sugiere papeles específicos y particulares *in vivo*. Hay varios mecanismos por los cuales las células regulan

actividad de MMPS y de TIMPS; éstas incluyen las rutas de señalización Smad, factor kappa nuclear B y los enzimas activados por grupos fosfatos como las *mitogen activated kinases* de sus siglas en inglés MAPKS. El papel de las MAPKS es clave en la regulación de la expresión de MMPS y de TIMPS, ya que estimula o inhibe transcripción dependiendo del tipo celular. Las MAPKS constituyen una familia de kinasas que ejecutan la transmisión de señales de la membrana citoplásmica al núcleo. Tres rutas distintas de MAPKS se han descrito detalladamente en mamíferos: ERK1/2, JNK y p38. En general, las MAPKS activan genes tempranos inmediatos (GTI) involucrados en reprogramar transcripción celular y genes tardíos (GT). Los GT ejecutan la mayoría de las respuestas celulares. Los GTI son activados rápida y transitoriamente por factores de crecimiento, ésteres del phorbol (PMA), anisomicina y el cyclohexamida. Estos genes no requieren ningún producto nuevo de la traducción para su inducción, puesto que no son bloqueados por inhibidores de la síntesis de las proteínas.

Antecedentes:

Los GTI no requieren de la síntesis de proteínas para su inducción; los procesos que coordinan estas proteínas integran la llamada respuesta primaria celular. La respuesta primaria celular involucra por lo general cambios irreversibles en la fisiología, dado que muchos GTI son reguladores transcripcionales. Aunque la vida media de muchos de los reguladores transcripcionales agrupados en la familia de GTI es muy reducida (en algunos casos 5 minutos), logran promover respuestas celulares de forma inmediata. Estos cambios efectuados de forma inmediata se mantienen a largo plazo. Nuestro interés se ha centrado en las familias de MMPs y TIMPs, dado que son proteínas claves en la remodelación de la **matrix** extracelular; al momento no hay estudios que muestren claramente su cinética de expresión y sus requerimientos de síntesis previa de proteínas para inducción.

Hipótesis:

Las *matrix* metaloproteasas y sus inhibidores son genes tardíos.

Objetivo General:

Determinar si las *matrix* metaloproteasas y sus inhibidores son genes tardíos o tempranos y si éstos requieren de síntesis de proteínas.

Metodología:

Las líneas celulares de fibroblastos humanos MRC-5 y WI-38 del pulmón fueron cultivados en medio esencial mínimo con el suero vacuno fetal. Las células fueron mantenidas en el CO₂. Para determinar si la síntesis de proteínas era necesaria, fueron incubadas durante la noche en el medio sin suero seguido por el estímulo de los inhibidores y/o de PMA por 8 horas. Para estudiar señalización fueron tratadas con los inhibidores por 30 minutos. Después de 30 minutos del tratamiento con estos inhibidores, éstas fueron estimuladas con PMA, anisomicina, emetine o cycloheximide por 8 horas. Para el análisis de la activación de MAPK, las células confluentes fueron incubadas durante la noche en el medio sin suero seguido por el tratamiento con PMA o inhibidores de la síntesis de las proteínas. Aislamiento de ARN. Las células fueron lavadas con PBS y el RNA total

fue cosechado usando el sistema total del aislamiento del RNA de SV de Promega. La calidad y la cantidad de RNA fueron establecidas leyendo la densidad óptica de cada

muestra en 260 nm y 280 nm usando un espectrofotómetro. Retrotranscripción- El RNA fue preincubado con iniciadores al azar a 70°C por 10 minutos y la reacción de reverso transcripción fue realizada a 42°C por 60 minutos. El PCR en tiempo fue realizado usando el sistema ABI PRIS PRIS 7700, las condiciones de la reacción y las secuencias de iniciadores y sondas se describen en Nuttall: 2003.

Resultados:

Hemos realizado un análisis extensivo de la respuesta transcripcional de las familias enteras de MMPs y de TIMPs en respuesta a PMA y tres inhibidores de proteínas: anisomicina, emetine y cyclohexamida en fibroblastos humanos en cultivo. Como lo anticipamos PMA indujo un subconjunto de MMPs y TIMPs vía ERK1/2, después de 8 horas de tratamiento, pero no después de 30 minutos, lo cual indica que estos genes son tardíos. A excepción de TIMP3 y de MMP9 todos los genes activados por PMA dependen de la síntesis de proteínas para su inducción.

El hecho de que MMP9 y TIMP3 no requieran de síntesis de proteínas para su inducción en respuesta a PMA, es muy importante y novedoso, ya que a la luz de los conocimientos actuales se había considerado que únicamente los genes reguladores transcripcionales podían ser expresados de forma temprana sin la necesidad de la síntesis de proteínas.

En nuestro conocimiento, éste es el primer reporte extensivo que demuestra que genes involucrados en la remodelación de la matriz extracelular, como MMP9 y TIMP3 tienen patrones de expresión tardía, sin requerir la síntesis de proteínas para su inducción.

Discusión:

Nuestro estudio identifica patrones comunes y únicos de la regulación de las MMPs y TIMPs en fibroblastos en cultivo. Un grupo importante de los genes comparte la cinética de la inducción tardía mediada por PMA vía ERK MAPK, cuyo requisito es la síntesis de proteínas previa. Sin embargo, nuestros datos acentúan la importancia de la consideración

de los efectos de los inhibidores de la síntesis de proteínas, puesto que en MMP9 y TIMP3, a pesar de mostrar una cinética tardía, su inducción es independiente de la síntesis de proteínas.

Referencias Bibliográficas:

1. Chang, C.; Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasión, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology*. 11, S37-S43
2. Egeblad, M.; Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev. Cancer*. 2, 161-174
3. López-Otín, C.; Overall, C.M. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 509-519
4. Puente, X.S.; Sánchez, L.M.; Overall, C.M.; López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev. Genet.* 4, 544-558
5. Overall, C.M., López-Otín, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer*. 2, 657-672
6. Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitman, S.E., Docherty, A.J.P., Angel, P., Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 6, 1899-1904
7. Edwards, D.R., Rocheleau, H., Sharma, R.R., Wills, A.J., Cowie, A., Hassell, J.A., Heath, J.K. (1992). Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim. Biophys. Acta.* 1171, 41-55
8. Baker, A.H.; Edwards, D.R.; Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115, 3719-3727
9. Yan, C., Boyd, D.D. 2007. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell Physiol.* 211, 19-26
10. Borden, P., Heller, R.A. 1997. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 7, 159-178
11. Westermarck, J., Li, S.P., Kallunki, T., Han, J., Kähäri, V.M. 2001. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2373-2383
12. Vincenti, M.P., Brinckerhoff, C.E. 2002. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 4, 157-164
13. Reunanen, N., Li, S. P., Ahonen, M., Foschi, M., Han, J., Kähäri, V. M. 2002. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* 277, 32360-32368
14. Hall, M.C., Young, D.A., Waters, J.G., Rowan, A.D., Chantry, A., Edwards, D.R., Clark, I.M. 2003. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J. Biol. Chem.* 278, 10304-10313
15. Cano, E., Mahadevan, L.C. 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122
16. Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183
17. Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C. 2002. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 30-40
18. Yang, S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh, A.J. 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene.* 320, 3-21
19. Auble, D.T., Brinckerhoff, C.E. 1991. The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for

phorbol induction of collagenase in fibroblasts.
Biochemistry. 30, 4629-4635

20. McDonnell, S.E., Kerr, L.D., Matrisian, L.M. 1990.
Epidermal growth factor stimulation of stromelysin
mRNA in rat fibroblasts requires induction of
proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of
protein kinase C. Mol. Cell. Biol. 10, 4284-4293
21. Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou,
V.E., Johnson, R., Spiegelman, B.M. 1994.
Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates
c-fos-dependent and -independent pathways for
gene expression stimulated by growth factors or
oncogenes. EMBO J. 13, 3094-3103